

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-270878

(43)Date of publication of application : 03.10.2000

(51)Int.CI.

C12N 15/09
C12M 1/00
C12M 3/00
C12Q 1/68
D06M 15/01

(21)Application number : 11-084100

(71)Applicant : MITSUBISHI RAYON CO LTD

(22)Date of filing : 26.03.1999

(72)Inventor : TO FUJIO
WATANABE FUMIAKI
FUJII WATARU
AKITA TAKASHI
MURASE KEI
ITO CHIHO

(54) NUCLEIC ACID-IMMOBILIZED GEL-HOLDING HOLLOW FIBER, ARRANGED BODY OF THE HOLLOW FIBER AND SECTION THEREOF

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject fiber capable of efficiently providing the section having a nucleic acid arbitrarily and accurately arranged in a high density, in good reproducibility, and useful for detection or the like of the kind and the amount of the nucleic acid by allowing a hollow part of the hollow fiber to hold a nucleic acid-immobilized gel.

SOLUTION: The objective nucleic acid-immobilized gel-holding hollow fiber holding the nucleic acid-immobilized gel in the hollow part of the hollow fiber is obtained by biotinylating a probe aminated by introducing NH₂(CH₂)₆ group to 5' terminus of an oligonucleotide by using biotin amidite, adding the obtained oligonucleotide having the biotin group at the 5' terminus to an aqueous solution containing acrylamide, methylenebisacrylamide, 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and an avidinized agarose, mixing them, injecting the obtained solution to the hollow part of a hollow fiber made of a nylon or the like (having 300 μm outer diameter), and allowing the injected fiber to stand still at 80° C for 4 hr in a hermetically sealed container the interior of which is saturated with steam to carry out a polymerization reaction.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-270878

(P2000-270878A)

(43)公開日 平成12年10月3日 (2000.10.3)

(51)Int.Cl.⁷
C 12 N 15/09
C 12 M 1/00
3/00
C 12 Q 1/68
D 06 M 15/01

識別記号
ZNA

F I
C 12 N 15/00
C 12 M 1/00
3/00
C 12 Q 1/68
D 06 M 15/01

テーマコード(参考)
4 B 0 2 4
A 4 B 0 2 9
Z 4 B 0 6 3
A 4 L 0 3 3

審査請求 未請求 請求項の数6 OL (全9頁)

(21)出願番号 特願平11-84100

(22)出願日 平成11年3月26日 (1999.3.26)

(71)出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都港区港南一丁目6番41号

(72)発明者 湯 不二夫

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱
レイヨン株式会社化学品開発研究所内

(72)発明者 渡辺 文昭

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三菱
レイヨン株式会社化学品開発研究所内

(74)代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔 (外1名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】核酸固定化ゲル保持中空纖維並びに該中空纖維配列体及びその薄片

(57)【要約】

【解決手段】核酸固定化ゲル保持中空纖維並びに核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体及びその薄片。

【効果】核酸が任意に高密度且つ正確に配列された核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の纖維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の核酸の種類および量を調べることができる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 中空纖維の中空部に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持中空纖維。

【請求項2】 請求項1記載の核酸固定化ゲル保持中空纖維の束を含む核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体。

【請求項3】 纖維配列体中の纖維が規則的に配列されたものである請求項2記載の核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体。

【請求項4】 纖維の束が、1cm²あたり100本以上の纖維を含むものである請求項2又は3記載の核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体。

【請求項5】 核酸の種類が、各纖維の全部又は一部において異なるものである請求項2～4のいずれか1項に記載の核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体。

【請求項6】 請求項2～5のいずれか1項に記載の纖維配列体の纖維軸と交差する切断面を有する、前記核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の薄片。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、核酸が固定化された高分子材料に関する。詳しくは、中空纖維の中空部に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持中空纖維並びに核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体及びその薄片に関する。

【0002】

【従来の技術】 近年、各種生物におけるゲノムプロジェクトが進められており、ヒト遺伝子をはじめとして、多数の遺伝子とその塩基配列が急速に明らかにされつつある。配列の明らかにされた遺伝子の機能については、各種の方法で調べることができるが、その有力な方法の一つとして、明らかにされた塩基配列情報を利用した遺伝子発現解析が知られている。例えば、ノーザンハイブリダイゼーションに代表されるような、各種の核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応や各種のPCR反応を利用した方法が開発され、当該方法により各種遺伝子とその生体機能発現との関係を調べることができる。しかしながら、これらの方では適用し得る遺伝子の数に制限がある。したがって、今日のゲノムプロジェクトを通して明らかにされつつあるような、一個体レベルという極めて多数の遺伝子から構成される複雑な反応系全体からみると、上記方法により遺伝子の総合的・系統的解析を行うことは困難である。

【0003】 最近になって、多数遺伝子の一括発現解析を可能とするDNAマイクロアレイ法(DNAチップ法)と呼ばれる新しい分析法、ないし方法論が開発され、注目を集めている。これらの方法は、いずれも核酸：核酸間ハイブリダイゼーション反応に基づく核酸検出・定量法である点で原理的には従来の方法と同じであるが、マイクロアレイ又はチップと呼ばれる平面基盤片上に、多数のDNA断片が高密度に整列固定化されたも

のが用いられている点に大きな特徴がある。マイクロアレイ法の具体的な使用法としては、例えば、研究対象細胞の発現遺伝子等を蛍光色素等で標識したサンプルを平面基盤片上でハイブリダイゼーションさせ、互いに相補的な核酸(DNAあるいはRNA)同士を結合させ、その箇所を蛍光色素等でラベル後、高解像度解析装置で高速に読みとる方法が挙げられる。こうして、サンプル中のそれぞれの遺伝子量を迅速に推定できる。即ち、この新しい方法の本質は、基本的には反応試料の微量量化と、その反応試料を再現性よく多量・迅速・系統的に分析、定量しうる形に配列・整列する技術との統合であると理解される。

【0004】 核酸を基盤上に固定化するための技術としては、上記ノーザン法同様、ナイロンシート等の上に高密度に固定化する方法の他、更に密度を高めるため、ガラス等の基盤の上にポリリジン等をコーティングして固定化する方法、あるいはシリコン等の基盤の上に短鎖の核酸を直接固相合成していく方法などが開発されている。

【0005】 しかし、例えば、ガラス等の固体表面を化学的又は物理的に修飾した基盤上に核酸をスポットティング固定化する方法[Science 270, 467-470(1995)]は、スポット密度でシート法より優れるものの、スポット密度及びスポット当たり固定できる核酸量がシリコン基盤上における直接合成法(U.S.Patent 5,445,934, U.S.Patent 5,774,305)と比較して少量であり、再現が困難である点が指摘されている。他方、シリコン等の基盤の上にフォトリソグラフィー技術を用い、多種の短鎖核酸をその場で規則正しく固相合成していく方法に関しては、単位面積当たりに合成しうる核酸種数(スポット密度)及びスポット当たりの固定化量(合成量)、並びに再現性等において、スポットティング法より優れるとされるものの、固定化しうる化合物種は、フォトリソグラフィーにより制御可能な比較的短鎖の核酸に限られる。さらに、高価な製造装置と多段の製造プロセスにより、チップ当たりの大きなコストダウンが困難とされる。その他、微小な担体上に核酸を固相合成しライブラリー化する手法として、微小なビーズを利用する方法が知られている。この方法は、チップ法より長鎖の核酸を多種・安価に合成することが可能であり、またcDNA等より長鎖の核酸も固定可能と考えられる。しかしながら、チップ法と異なり、指定の化合物を指定の配列基準で再現性よく整列させたものを作製することは困難である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 このような状況下、鎖長によらず核酸を所定の濃度に固定化でき、測定可能な形に高密度に再現よく配列化可能で、安価な大量製造に適応しうる新たな体系的方法論の確立は、今後重要性を増すと考えられる遺伝子解析に強く求められるものであり、本発明が解決しようとする課題である。

【0007】具体的には、本発明が解決しようとする課題は、ナイロンシートやガラス基盤のような二次元担体上への微量スポットティングや微量分注による核酸配列体製造法に比べ、核酸固定化量が高く、単位面積あたり配列される核酸分子種の高密度化が可能で、大量生産により適した配列体、すなわち核酸が固定化された二次元的(平面的)配列体(固定化核酸二次元配列体という)の製造法の確立である。また、本発明が解決しようとする課題はシリコン基盤上へのフォトリソグラフィーと固相合成との組み合わせによる高密度オリゴ核酸配列体製造法と比べ、cDNAを含む長鎖の核酸にも適応可能で、製造コストのより低い固定化核酸二次元配列体製造法の確立である。そこで、本発明は、核酸固定化ゲル保持中空纖維並びに核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体及びその薄片を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、上述の如き課題を解決すべく、鋭意検討を重ねた結果、核酸整列化プロセスと固定化プロセスとを同一の二次元担体上で行う従来法の発想を改め、核酸の固定化プロセスを一次元構造体としての纖維上(1本の纖維上)に独立して行い、それらの整列化プロセスに各種の纖維賦形化技術を導入することにより三次元構造体としての纖維束を作製し、得られる纖維束の切片化プロセスを経ることで、固定化核酸二次元高密度配列体を作製し得ることを見いだし、本発明を完成するに至った。すなわち、本発明は、中空纖維の中空部に核酸固定化ゲルが保持された核酸固定化ゲル保持中空纖維である。

【0009】さらに、本発明は、前記核酸固定化ゲル保持中空纖維の束を含む核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体である。該配列体としては、例えば配列体中の纖維が規則的に配列されたものが挙げられ、1cm²あたり100本以上の纖維を含むものが挙げられる。また、核酸固定化ゲルに含まれる核酸の種類としては、各纖維の全部又は一部において異なるものが挙げられる。さらに、本発明は、前記核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の纖維軸と交差する切断面を有する、前記核酸固定化中空纖維配列体の薄片である。

【0010】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。本発明は、核酸が固定化されたゲルを保持する中空纖維(以下、「核酸固定化ゲル保持中空纖維」ともいう。)である。本発明において、ゲルに固定化する対象となる核酸としては、デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)が挙げられる。本発明に用いる核酸は、市販のものでもよく、また、生細胞などから得られた核酸でもよい。

【0011】生細胞からのDNA又はRNAの調製は、公知の方法、例えばDNAの抽出については、Blinらの方法(Blin et al., Nucleic Acids Res. 3: 2303 (19

76))等により、また、RNAの抽出については、Favaloroらの方法(Favaloro et al., Methods Enzymol. 65: 718 (1980))等により行うことができる。固定化する核酸としては、更に、鎖状若しくは環状のプラスミドDNAや染色体DNA、これらを制限酵素により若しくは化学的に切断したDNA断片、試験管内で酵素等により合成されたDNA、あるいは、化学合成したオリゴヌクレオチド等を用いることもできる。

【0012】本発明に用いることができるゲルの種類は特に制限されないが、例えばアクリルアミド、N,N-ジメチルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-アクリロイルアミノエトキシエタノール、N-アクリロイルアミノプロパノール、N-メチロールアクリルアミド、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシエチルメタクリレート、(メタ)アクリル酸、アリルデキストリン等の単量体の一種類または二種類以上と、メチレンビス(メタ)アクリルアミド、ポリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート等との多官能性単量体を共重合したゲルを用いることができる。その他本発明に用いることのできるゲルとして、例えばアガロース、アルギン酸、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール等のゲル、またはこれらを架橋したゲルを用いることができる。

【0013】本発明では、核酸をそのままゲルに固定化してもよく、また、核酸に化学的修飾を施した誘導体や、必要に応じて変成させた核酸を固定化してもよい。核酸のゲルへの固定化には、ゲルに物理的に包括する方法や、ゲル構成成分への直接的な結合を利用してもよく、核酸を一旦高分子体や無機粒子などの担体に共有結合又は非共有結合により結合させ、その担体をゲルに固定化してもよい。

【0014】例えば、核酸の末端基にビニル基を導入し(WO98/39351)、アクリルアミド等のゲルの構成成分と共に重合させることができる。共重合においては、単量体、多官能性単量体及び重合開始剤と共に共重合する方法、単量体及び重合開始剤と共に共重合したのち、架橋剤でゲル化する方法などがある。また、アガロースを臭化シアン法でイミドカルボネート化しておき、末端アミノ化した核酸のアミノ基と結合させてからゲル化することもできる。この際、核酸固定化したアガロースと他のゲル(例えばアクリルアミドゲル等)との混合ゲルにしてもよい。

【0015】その他の方法としては、高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合し、該粒子を上述のゲルに包括固定化する方法が挙げられる。例えば、ビオチン化した核酸とアビジン化したアガロースビーズ(シグマ社製アビジン化アガロース等)を反応させることによって、核酸が固定化されたアガロースビーズを得ることができる。核酸固定化アガロースビーズはアクリルアミドゲル等に包括固定化することができる。

【0016】また、ゲルや担体への結合においては、グルタルアルデヒドや1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDC)等の架橋剤を用いて結合させることもできる。核酸の一般的な化学的修飾としては、アミノ化、ビオチン化、ディゴキシゲニン化等が知られているが[Current Protocols In Molecular Biology, Ed.; Frederick M. Ausubel et al. (1990)、脱アイソトープ実験プロトコール(1) DIGハイブリダイゼーション(秀潤社)]、本発明ではこれらのいずれの修飾法も採用することができる。一例として、核酸へのアミノ基導入に関して説明する。

【0017】アミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖と一本鎖核酸との結合位置は特に限定されるものではなく、核酸の5'末端または3'末端のみならず核酸の鎖中(例えば、リン酸ジエステル結合部位または塩基部位)であってもよい。この一本鎖核酸誘導体は、特公平3-74239号公報、米国特許4,667,025号、米国特許4,789,737号等に記載の方法にしたがって調製することができる。この方法以外にも、例えば、市販のアミノ基導入用試薬[例えば、アミノリンクII(商標名)；PEバイオシステムズジャパン社、Amino Modifiers(商標名)；クロンテック社]などを用いて、又はDNAの5'末端のリン酸にアミノ基を有する脂肪族炭化水素鎖を導入する周知の方法(Nucleic Acids Res., 11(18), 6513-(1983))にしたがって調製することができる。本発明において、核酸固定化ゲル保持中空纖維として用いることができる中空纖維としては、合成纖維、半合成纖維、再生纖維、天然纖維等が挙げられる。

【0018】合成纖維の代表例としては、ナイロン6、ナイロン66、芳香族ポリアミド等のポリアミド系の各種纖維、ポリエチレンテレフタレート、ポリブチレンテレフタレート、ポリ乳酸、ポリグリコール酸等のポリエステル系の各種纖維、ポリアクリロニトリル等のアクリル系の各種纖維、ポリエチレンやポリプロピレン等のポリオレフィン系の各種纖維、ポリビニルアルコール系の各種纖維、ポリ塩化ビニリデン系の各種纖維、ポリ塩化ビニル系纖維、ポリウレタン系の各種纖維、フェノール系纖維、ポリフッ化ビニリデンやポリテトラフルオロエチレン等からなるフッ素系纖維、ポリアルキレンパラオキシベンゾエート系の各種纖維などが挙げられる。

【0019】半合成纖維の代表例としては、ジアセテート、トリアセテート、キチン、キトサン等を原料としたセルロース系誘導体系各種纖維、プロミックスと呼称される蛋白質系の各種纖維などが挙げられる。再生纖維の代表例としては、ビスコース法や銅-アンモニア法、あるいは有機溶剤法により得られるセルロース系の各種再生纖維(レーヨン、キュプラ、ポリノジック等)などが挙げられる。天然纖維の代表例としては、亞麻、苧麻、黄麻などが挙げられる。これらの植物纖維は、中空状の纖維形態を示すので本発明に用いることができる。

【0020】天然纖維以外の中空纖維は、特殊なノズルを用いて公知の方法で製造することができる。ポリアミド、ポリエステル、ポリオレフィン等は溶融紡糸法が好ましく、ノズルとしては馬蹄型やC型ノズル、2重管ノズルなどを使用することができる。本発明においては、連続した均一な中空部を形成させることができる点で2重管ノズルを用いるのが好ましい。溶融紡糸ができない合成高分子、半合成纖維又は再生纖維に用いられる高分子の紡糸は溶剤紡糸が好ましく用いられる。この場合も、溶融紡糸と同じく2重管ノズルを用いて、中空部に芯材として適切な液体を充填しながら紡糸することにより連続した中空部を有する中空纖維を得ることができる。

【0021】本発明に用いる纖維は、特にその形態が規定されるものではない。また、モノフィラメントであってもよく、マルチフィラメントであってもよい。さらに、短纖維を紡績した紡績糸でもよい。尚、マルチフィラメントや紡績糸の纖維を用いる場合には、核酸固定化ゲルの保持に、単纖維間の空隙等を利用することも可能である。本発明に用いる中空纖維は、無処理の状態でそのまま用いてもよいが、必要に応じて、反応性官能基を導入したものであってもよく、また、プラズマ処理や γ 線、電子線などの放射線処理を施したものであってもよい。

【0022】核酸固定化ゲル保持中空纖維を作製する方法は、特に制限されるものではないが、中空纖維とゲルとの間における各種化学的又は物理的な相互作用、すなわち纖維が有している官能基と、ゲルを構成する成分との間の化学的又は物理的な相互作用を利用することができる。例えば単量体、多官能性単量体、開始剤及び核酸または末端にビニル基を有する核酸を混合した液に纖維を浸し重合、ゲル化させる方法が挙げられる。また、単量体、多官能性単量体、開始剤及び高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合したものを混合した液に中空纖維を浸し重合、ゲル化させる方法が挙げられる。

【0023】その他に、単量体、開始剤及び末端にビニル基を有する核酸を共重合したものと架橋剤を混合した液に中空纖維を浸しゲル化する方法、単量体を開始剤で重合したもの、架橋剤および核酸または高分子粒子や無機粒子等の担体に核酸を結合した粒子を混合した液に中空纖維を浸しゲル化する方法、核酸を固定化したアガロース等を加熱溶解し、中空纖維を浸し、冷却ゲル化させる方法等が挙げられる。また、上記核酸を含む液を中空纖維の中空部に注入することにより、中空部のみに核酸固定化ゲルを保持させることができる。

【0024】本発明においては、中空纖維の中空部に核酸固定化ゲルを保持できるのが特徴であるが、中空部に保持したのと同様、その纖維の外壁部にも保持することができる。従って、纖維断面から見れば外壁部及び中空部の両方に固定化が可能であり、単位断面積あたりの核

酸固定量が通常の繊維に比べて大きくできることが特徴である。また、中空部にのみ核酸固定化ゲルを保持した場合は、配列体を作製（後述）するときに使用する接着剤が付着しないため、有効に（接着剤の影響を受けることなく正確に）固定化核酸プローブとして使用することができる。

【0025】上述の方法により得られた核酸固定化ゲル保持中空繊維は、ゲルが破壊されない限りにおいて適当な処理をすることができる。例えば、熱処理、アルカリ処理、界面活性剤処理などを行うことにより、固定化された核酸を変成させる。あるいは、細胞、菌体などの生材料から得られた核酸を使用する場合は、不要な細胞成分などを除去する。そして、処理後の核酸固定化ゲル保持中空繊維を核酸を検出する材料として用いることができる。なお、これらの処理は別々に実施してもよく、同時に実施してもよい。また、核酸を含む試料を中空繊維内部に保持する前に、適宜実施してもよい。

【0026】上記の通り調製された核酸固定化ゲル保持中空繊維は、本発明の核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を構成する基本単位とすることができる。そして、これらの核酸固定化ゲル保持中空繊維を束束した後に接着して、核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体となすことができる。この際、核酸固定化ゲル保持中空繊維を規則的に配列し、樹脂接着剤等で接着することにより、例えば、縦横に核酸固定化ゲル保持中空繊維が整然と規則的に配列した核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を得ることができる。核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体の形状は特に限定されるものではないが、通常は、繊維を規則的に配列させることにより正方形又は長方形に形成される。

【0027】「規則的に」とは、一定の大きさの枠の中に含まれる核酸固定化ゲル保持中空繊維の本数が一定となるように順序よく配列させることをいう。例えば、直径1mmの核酸固定化ゲル保持中空繊維を束にして断面が縦10mm、横10mmの正方形となるように配列させようとする場合は、その正方形の枠内（1cm²）における1辺に含まれる核酸固定化ゲル保持中空繊維の数を10本とし、この10本の核酸固定化ゲル保持中空繊維を1列に束ねて1層のシートとした後、このシートが10層になるように重ねる。その結果、縦に10本、横に10本、合計100本の核酸固定化ゲル保持中空繊維を配列させることができる。但し、核酸固定化ゲル保持中空繊維を規則的に配列させる手法は、上記のようにシートを重層するものに限定されるものではない。

【0028】この場合に、特定の核酸が固定化された核酸固定化ゲル保持中空繊維の位置があらかじめ決められた状態で配列することが望ましいが、必ずしもそのように配列させる必要はない。その理由は、配列体を形成した段階では特定の核酸を固定化した核酸固定化ゲル保持中空繊維がどの位置に存在するのかが不明でも、配列体

の断面を切断した後、一旦ハイブリダイゼーション手法等を用いて断面における核酸の配置位置を決定することにより、特定の核酸が固定された核酸固定化ゲル保持中空繊維の位置を確認することができるためである。従って、この手法を用いて、一度、薄片内に配置された複数種類の核酸の位置を決定しておけば、同一配列体から得られる薄片はすべて同一の位置配置であるので、同一配列体から得られるすべての薄片の核酸の位置配置がわかる。

【0029】なお、本発明において束にする核酸固定化ゲル保持中空繊維の本数は100本以上、好ましくは1,000～10,000,000本であり、目的に応じて適宜設定することができる。但し、配列体における核酸固定化ゲル保持中空繊維の密度が、1cm²当たり100～1,000,000本となるように調製する方が好ましい。そして、高密度に核酸が固定化された配列体の薄片を得るべく核酸固定化ゲル保持中空繊維を配列させるためには、核酸固定化ゲル保持中空繊維の太さは細い方が好ましい。本発明の好ましい実施態様においては、核酸固定化ゲル保持中空繊維1本の太さは1mm以下であることが必要である。

【0030】核酸固定化ゲル保持中空繊維が直径50μmのモノフィラメントの場合、1cmあたり200本の繊維を配列させることができるために、1cm²の正方形内に配列させることのできる繊維の本数は40,000本である。したがって、この場合は1cm²あたり最高40,000種類の核酸を固定化することができる。ゲルに固定化されている核酸の種類は、配列体中の各繊維ごとにそれぞれ異なるものとすることが可能であり、また、同一の核酸が固定化された繊維から任意の本数の繊維を選択し、その選択された繊維を束ねて適宜配列させることも可能である。即ち、本発明によれば、固定化された核酸の種類と配列の順序に関しては、目的に応じて任意に設定することができる。

【0031】本発明においては、上述の核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体を繊維軸と交差する方向、好ましくは繊維軸に対して垂直方向に切断することにより、任意に配列された核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体断面を有する薄片を得ることができる。この際の切断方法としては、例えば、ミクロトームを用いて配列体から薄片を切り出す方法等が挙げられる。薄片の厚みに関しては任意に調整することができるが、通常1～5,000μm、好ましくは10～2,000μmである。

【0032】得られた核酸固定化ゲル保持中空繊維配列体断面を有する薄片には、該配列体を構成する核酸固定化ゲル保持中空繊維の数に応じた核酸が存在する。薄片の断面積あたりの核酸の数に関しては、用いる核酸固定化ゲル保持中空繊維の外径や配列体作製時の方法等を適宜選択することにより、薄片断面積1cm²あたり100個以上の核酸が固定化された薄片を作製することが

可能であり、更には、薄片断面積1cm²あたり1000個以上の核酸が固定化された薄片を作製することも可能である。

【0033】これら薄片は、固定化された核酸をプローブとして、検体と反応させてハイブリダイゼーションを行うことにより、検体中の特定の塩基配列を有する核酸の検出に用いることができる。本発明で言うプローブとは、狭義には検出すべき遺伝子の塩基配列に相補的な塩基配列を有する核酸を指す。即ち、本発明の核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体断面を有する薄片を検体と反応させてハイブリダイゼーションを行い、プローブと相補的な検体中に存在する核酸とのハイブリッドを形成させ、このハイブリッドを検出することにより、目的とする塩基配列を有する検体中の核酸を検出することができる。また、本発明で言うプローブとは、広義には検体中に存在するタンパク質や低分子化合物等と特異的に結合することができる核酸を指す。従って、これらの薄片の利用法としては、固定化された核酸（プローブ）とハイブリッドを形成する核酸を検出するための利用に留まらず、固定化された核酸と特異的に結合するタンパク質や低分子化合物等の各種試料（例えば生体成分等）を検出するための利用が挙げられる。

【0034】固定化された核酸とハイブリッドを形成する核酸や、固定化された核酸と特異的に結合する各種生体成分の検出には、公知の手段を用いることができる。例えば、検体中の核酸、タンパク質又は低分子化合物等に、蛍光物質、発光物質、ラジオアイソトープなどの標識体を作用させ、この標識体を検出することができる。これら標識体の種類や標識体の導入方法等に関しては、何ら制限されることはなく、従来公知の各種手段を用いることができる。

【0035】

【実施例】本発明を以下の実施例によって更に詳細に説

アクリルアミド

メチレンビスアクリルアミド

2,2-アゾビス(2-アミジノプロパン)二塩酸塩

ビオチン化オリゴヌクレオチド（プローブAまたはプローブB）

アビジン化アガロース(6%)懸濁液

【0039】本溶液を、参考例1及び参考例2で前処理したナイロン製中空纖維（外径300ミクロン）の中空部に注入した後、内部が水蒸気で飽和された密閉ガラス容器に移し、80℃にて4時間放置することにより重合反応を行った。その結果、オリゴヌクレオチド（プローブAまたはプローブB）がビオチニアビジン結合を介して固定化されたゲルを内部に保持する中空纖維が得られた。図1において、(1)はプローブAが固定されたゲルを保持する中空纖維、(2)はプローブBが固定されたゲルを保持する中空纖維を表す。また、(3)及び(4)の纖維束のうち白丸(○)で表示した纖維はプローブAが固定化されたものを、黒丸(●)で表示した纖維はプローブB

明する。但し、本発明はこれら実施例によりその技術的範囲が限定されるものではない。

参考例1

中空纖維の前処理(1)：ナイロン製中空纖維（外径約300μm）約1mの中空部に、室温の蟻酸（純度99%）0.1mLを注入し、10秒間保持した。次に、中空部に室温の水を多量に注入して十分洗浄後、乾燥して、ナイロン製中空纖維の前処理を行った。

参考例2

10 中空纖維の前処理(2)：蟻酸（純度99%）の代りに、硫酸の10%エタノール溶液を用いた以外は、実施例1と同様にナイロン製中空纖維の前処理を行った。

【0036】参考例3

5 末端にアミノ基またはビオチンを有するオリゴヌクレオチドの調製：以下に示したオリゴヌクレオチド（プローブA、プローブB）を合成した。

プローブA：GCGATCGAACCTTGCTGTACGAGCCAGGGCTC（配列番号1）

プローブB：GATGAGGTGGAGGTCAAGGTTGGACAGCAG（配列番号2）

【0037】オリゴヌクレオチドの合成はPEバイオシステムズ社の自動合成機DNA/RNA synthesizer (mode 1394)を用いて行い、DNA合成の最終ステップで、アミノリンクII（商標名）（アプライドバイオシステム社）を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂(CH₂)₆-を導入しアミノ化したプローブを、およびビオチニアミダイトを用いてビオチン化したプローブを調製した。これらは、一般的手法により脱保護及び精製して使用した。

30 【0038】実施例1 核酸固定化ゲル保持中空纖維の作製(1)：参考例3で得られた5末端にビオチン基を有するオリゴヌクレオチドを含む、以下の組成からなる水溶液を作製した。

3.7重量部

0.3重量部

0.1重量部

0.005重量部

1.0重量部

が固定されたものを表す。

【0040】実施例2

核酸固定化ゲル保持中空纖維の作製(2)：ナイロン製中空纖維の代わりに、表面を親水化処理したポリエチレン製中空纖維（外径約300μm、ポリエチレン-ビニルアルコール共重合体で表面を被覆）を用いて、実施例1と同様の方法により、核酸固定化ゲル保持中空纖維を得た。

【0041】実施例3

核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の作製：実施例1で得たプローブA固定化ゲルを保持するナイロン中空纖維（参考例1の表面処理を行ったもの、長さ20cm）2

0本を、テフロン板上に互いに重なることなく且つ密着させて配列し、両端を固定した。これに、ポリウレタン樹脂接着剤(日本ポリウレタン工業(株)コロネット4403、ニッポラン4223)を薄く塗布し、ポリウレタン樹脂が十分に固まった後、これをテフロン板上から剥がし、プローブA固定化ゲルを保持する中空纖維が一列に配列したシート状物を得た。一方、プローブB固定化ゲルを保持する中空纖維についても、同様の操作によりシート状物を得た。次いで、これらのシート状物を図1(3)の配列となるように20枚積層し、上記接着剤を使用して接着し、縦横各々20本ずつ、計400本の纖維が規則的に正方に配列した核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体を得た。参考例2により表面処理を行った纖維に対しても同様の操作により核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体を得た。さらに、実施例2で得られた核酸固定化ゲル保持中空纖維についても、上記と同様にして核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体を得た。

【0042】実施例4

核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の薄片の作製：実施例3で得られた核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体を、纖維軸に直角方向にミクロトームを用いて100μmの厚さに切り出すことにより、縦横各々20本、計400本の纖維断面が規則的に正方に配列された核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の薄片を得た(図1(4))。

【0043】参考例4

試料核酸の標識：試料核酸のモデルとして、参考例3で合成したオリゴヌクレオチド(プローブA、プローブB)の配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド(C,D)を合成した。

オリゴヌクレオチドC：GAGCCCTCGCTCGTACAGCAAGGTTTCG

(配列番号3)

オリゴヌクレオチドD：CTGCTGTCCCAAACCCCTGACCTCCACC
ハイブリダイゼーション溶液組成：

5xSSC(0.75M 塩化ナトリウム、0.075Mクエン酸ナトリウム、pH7.0)
5%プロッキング試薬(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)
0.1% N-ラウロイルザルコシンナトリウム
0.02% SDS(ラウリル硫酸ナトリウム)
5% ホルムアミド

【0048】参考例6

検出：ハイブリダイゼーション終了後、核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体薄片を、あらかじめ保温しておいた50mLの0.1×SSC、0.1%SDS溶液に移し、振盪しながら20分間の洗浄を45℃で3回行った。DIG緩衝液1を加え、室温で振盪しながらSDSの除去を行った。これを再度繰り返した後、DIG緩衝液2を加え1時間振盪した。緩衝液を除いた後、DIG緩衝液2に10000分の1量の抗DIGアルカリフォスファターゼ標識抗体溶液をえた溶液10mLを加え、30分間ゆっくり振盪させることにより抗原抗体反応を行わせた。次に0.2%Tween 20を含むDIG緩衝液1で15分間2回振盪することにより洗浄し、引

(配列番号4)

【0044】これらのオリゴヌクレオチドの5'末端を、参考例3と同様にしてアミノリンクII(商標名)(PEバイオシステムズジャパン社)を用いてそれぞれのオリゴヌクレオチドの5'末端にNH₂(CH₂)₆-を導入した後、以下のようにしてディゴキシゲニン(DIG: Digoxigenin、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)で標識した。末端アミノ化されたオリゴヌクレオチドをそれぞれ100mMホウ酸緩衝液(pH8.5)に終濃度2mMになるように溶かした。等量のDigoxigenin-3-O-methylcarbonyl-ε-aminocapronic acid-N-hydroxy-succinimide ester(26mg/mLジメチルホルムアミド溶液)を加え、室温にて一晩静置した。

【0045】量を100μLに調整し、2μLのグリコーゲン(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)、10μLの3M酢酸ナトリウム(pH5.2)、300μLの冷エタノールを加え、15,000rpm 15分の遠心により沈殿を回収した。沈殿に500μLの70%エタノールを加え15,000rpm 5分の遠心により沈殿を再びチューブの底に集めた。沈殿を風乾し、100μLの10mM Tris-HCl(pH7.5), 1mM EDTAに溶かした。こうして得られたDIG標識オリゴヌクレオチドを試料核酸のモデルとして用いた。

【0046】参考例5

ハイブリダイゼーション：実施例4で作製した核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体薄片をハイブリダイゼーション用のバッグに入れ、以下の組成からなるハイブリダイゼーション溶液を注ぎ込み、45℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行った。参考例4で得られたDIG標識DNAを加え、45℃で15時間ハイブリダイゼーションを行った。

【0047】

き続き DIG緩衝液3に3分間浸した。DIG緩衝液3を除いた後、AMPPDを含むDIG緩衝液3mLを加え、10分間平衡化した。

【0049】水分をきり、新しいハイブリダイゼーション用バッグに移し、37℃で1時間おいた後、X線フィルム用のバインダーにX線フィルムとともに挟みフィルムを感光させた。その結果、何れも、プローブAが配置された場所には、オリゴヌクレオチドCが結合し、プローブBが配置された場所には、オリゴヌクレオチドDが結合していることが確認された。

【0050】DIG緩衝液1：0.1Mマレイン酸、0.15M塩化ナトリウム(pH7.5)

DIG緩衝液2：DIG緩衝液1に0.5%濃度でブロッキング試薬を添加したもの

DIG緩衝液3：0.1Mトリス-塩酸(pH9.5)、0.1M塩化ナトリウム、0.05M塩化マグネシウム

ブロッキング試薬：抗DIGアルカリフェオヌクレオチド標識抗体溶液およびAMPPDはDIG Detectionキット(ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社)中の試薬である。

【0051】

【発明の効果】本発明により、核酸固定化ゲル保持中空纖維並びに核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体及びその薄片が提供される。本発明によれば、核酸が任意に高密度且つ正確に配列された核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体の纖維断面を有する薄片を再現性よく効率的に得ることができる。この薄片を用いて、検体中の核酸の種

10

類および量を調べることができる。

【0052】本発明を従来法と比較した利点、有用性としては、例えば、固定化プロセスを二次元平面上で行わず、一次元構造体としての纖維上で分離・独立して行うことにより、鎖長によらず核酸の定量的固定が可能となったこと、整列化プロセスに各種の纖維網形化技術、ないし纖物作製技術の導入による高密度化が可能となったこと、また、その結果得られる選られる三次元構造体としての纖維束から目的とする二次元配列体を作製するため、従来法にはない薄片化プロセスが新たに導入されたが、それに伴いスポットティング法のような誤差の多い微量分注操作が不要となり、連続切片化を通じた多量生産が可能となったこと等があげられる。

【0053】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.	
<120> A HOLLOW FIBER HOLDING NUCLEIC ACID-FIXED GEL, AN ARRAY OF THE FIBERS AND A SLICE OF THE ARRAY	
<130> P99-0166	
<140>	
<141>	
<160> 4	
<170> Patent In Ver. 2.0	
<210> 1	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 1	
gcgatcgaaa ctttgctgtta cgagcgaggg ctc	33
<210> 2	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 2	
gatgagggtgg aggtcagggt ttggacagc ag	32
<210> 3	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DNA	
<400> 3	
gagccctcgc tcgtacagca aggtttcg	28
<210> 4	
<211> 27	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Synthetic DNA
 <400> 4
 ctgctgtccc aaaccctgac ctccacc

【0054】

【配列表フリーテキスト】

配列番号1：合成DNA

配列番号2：合成DNA

配列番号3：合成DNA

配列番号4：合成DNA

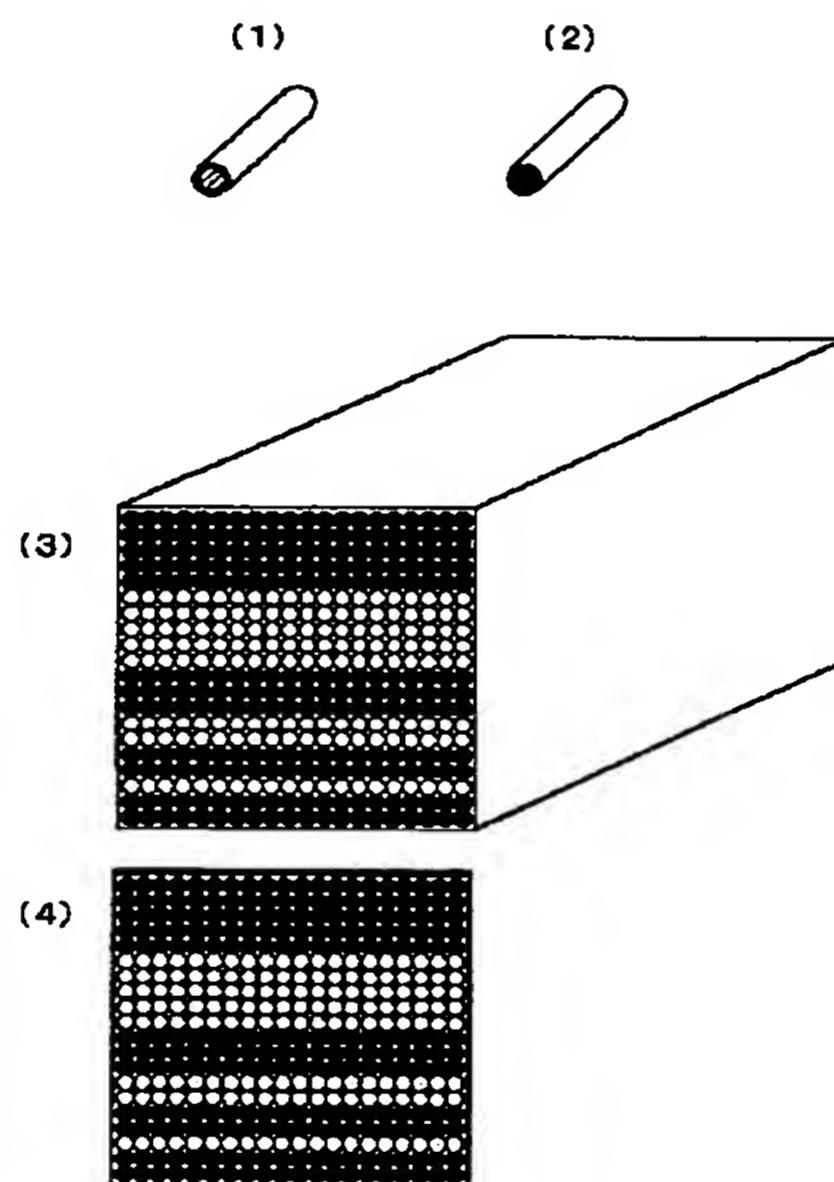
【図面の簡単な説明】

【図1】図1は核酸固定化ゲル保持中空纖維並びに核酸

27

固定化ゲル保持中空纖維配列体及びその薄片の模式図である。(1)はプローブAが固定化された核酸固定化ゲル保持中空纖維、(2)はプローブBが固定化された核酸固定化ゲル保持中空纖維、(3)はこれら2種の核酸固定化ゲル保持中空纖維からなる核酸固定化ゲル保持中空纖維配列体、及び(4)はこの核酸固定化ゲル保持中空配列体を纖維軸に対して垂直方向に切断した断面を示す。

【図1】



フロントページの続き

(72)発明者 藤井 渉
神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 三
菱レイヨン株式会社化学品開発研究所内
(72)発明者 秋田 隆
広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ
ン株式会社中央技術研究所内
(72)発明者 村瀬 圭
広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ
ン株式会社中央技術研究所内

(72)発明者 伊藤 千穂
広島県大竹市御幸町20番1号 三菱レイヨ
ン株式会社中央技術研究所内
F ターム(参考) 4B024 AA20 BA80 CA09 HA11
4B029 AA21 BB20 CC05 CC12
4B063 QA01 QA13 QQ42 QR32 QR55
QS34 QX01
4L033 AB02 AC15 BA45 BA76 CA01